



PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)	
International application No. PCT/EP98/08382	Applicant's or agent's file reference 0050/048715
International filing date (day/month/year) 18 December 1998 (18.12.98)	Priority date (day/month/year) 15 January 1998 (15.01.98)
Applicant POMPEJUS, Markus et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 August 1999 (12.08.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer F. Baechler Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

20

Translation
5640

09/582779

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0050/048715	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/08382	International filing date (day/month/year) 18 December 1998 (18.12.98)	Priority date (day/month/year) 15 January 1998 (15.01.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/52		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 August 1999 (12.08.99)	Date of completion of this report 05 April 2000 (05.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/08382

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-19, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-15, filed with the letter of 16 February 2000 (16.02.2000),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/08382

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1.1 The application describes the cloning of an orotidine-5'-phosphate decarboxylase (*ura3*) from *Ashbya gossypii*, as well as the use thereof for producing auxotrophic *A. gossypii* strains.

1.2 Novelty and inventive step

The claimed nucleic acid sequences are not disclosed by the cited prior art and are therefore novel. The closest related known gene from *Candida glabrata* (Zhou et al., 1994) has approximately 68% sequence homology.

The prior art describes a number of homologous genes from a number of biotechnically interesting micro-organisms, as well as methods for the cloning thereof (see the literature cited in the search report). Consequently the cloning of the corresponding gene from *A. gossypii* and the use thereof would at first appear obvious. However, since cloning using the method that is obvious to a person skilled in the art would not lead to any useable result, and only exceptionally expensive methods would lead to the aim being striven for, an

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/08382

inventive step can be acknowledged for the claimed sequences from *A. gossypii* (Seq. ID No. 1).

The claims relating to the gene and the use thereof are therefore considered inventive.

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 10 APR 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT) :

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/048715	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08382	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/12/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/01/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/52		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/08/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.04.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Stolz, B Tel. Nr. +49 89 2399 8416 



I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-15 eingegangen am 16/02/2000 mit Schreiben vom 16/02/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	



2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt



1. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) PCT

1.1. Die Anmeldung beschreibt die Klonierung einer Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase (ura3) aus *Ashbya gossypii*, sowie deren Verwendung zur Herstellung auxotropher *A. gossypii* Stämme.

1.2. Neuheit und Erfinderische Tätigkeit

Die beanspruchten Nukleinsäuresequenzen sind im zitierten Stand der Technik nicht verzeichnet und daher neu. Das am nächsten verwandte, bekannte Gen aus *Candida glabrata* (Zhou et al., 1994) besitzt ungefähr 68% Sequenzhomologie.

Eine Vielzahl homologer Gene aus einer Vielzahl biotechnisch interessanter Mikroorganismen sowie Verfahren zu ihrer Klonierung sind im Stande der Technik beschrieben (siehe die zitierte Literatur des Recherchenberichts). Deshalb müsste die Klonierung des entsprechenden Gens aus *A. gossypii* und dessen Verwendung zunächst als naheliegend angesehen werden. Da jedoch die Klonierung mittels der dem Fachmann naheliegenden Verfahren zu keinem brauchbaren Resultat führte, und erst aussergewöhnlich aufwendige Methoden zum Ziel führten, kann für die beanspruchten Sequenzen aus *A. gossypii* (Seq. ID no. 1) ein erfinderisches Element bejaht werden.

Die auf das Gen und dessen Verwendung gerichteten Ansprüche werden daher für erfinderisch gehalten.



Patentansprüche

1. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen.
2. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen oder seine Homologen aus *Ashbya gossypii* stammt.
3. Aminosäuresequenzen codiert durch ein Gen oder seine Homologe gemäß Anspruch 1 oder 2.
4. Aminosäuresequenzen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um enzymatisch aktive Proteine handelt.
5. Genkonstrukt enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Gen oder seine Homologen funktionell mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
6. Genkonstrukt nach Anspruch 5, deren Genexpression durch die Regulationssignale erhöht wird.
7. Vector enthaltend ein Genkonstrukt gemäß Anspruch 5 oder 6.
8. Mikroorganismus enthaltend mindestens ein Genkonstrukt gemäß Anspruch 5 oder 6.
9. Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2 so verändert, daß das durch das Gen codierte Protein inaktiv ist, und daß man dieses veränderte Gen in die Mikroorganismen einführt und über homologe Rekombination in das Genom der Organismen integriert und anschließend diese Mikroorganismen auf 5-Fluororotsäureresistenz selektioniert.
10. Verfahren zum Einbringen von DNA in Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienten Mikroorganismus einen Vector einbringt, der ein intaktes Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2 zusammen mit mindestens einem weiteren Gen



enthält, und diesen Mikroorganismus auf oder in einem Kulturmedium ohne Uracil anzieht.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als
5 Vector eine lineare DNA verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienter Mikroorganismus ein *Ashbya gossypii* Stamm verwendet wird.
10
13. Verfahren nach Anspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavinsynthese in den Mikroorganismus eingebracht wird.
- 15 14. Verwendung einer Gen-Sequenz oder seiner Homologen gemäß Anspruch 1 oder 2 als Selektionsmarker.
15. Verwendung nach Anspruch 14 in *Ashbya gossypii*.

20

25

30

35

40

45



PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

09/582,779
Paper # 3 Attach
(IDS)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/048715	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/ 08382	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/12/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/01/1998
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen,

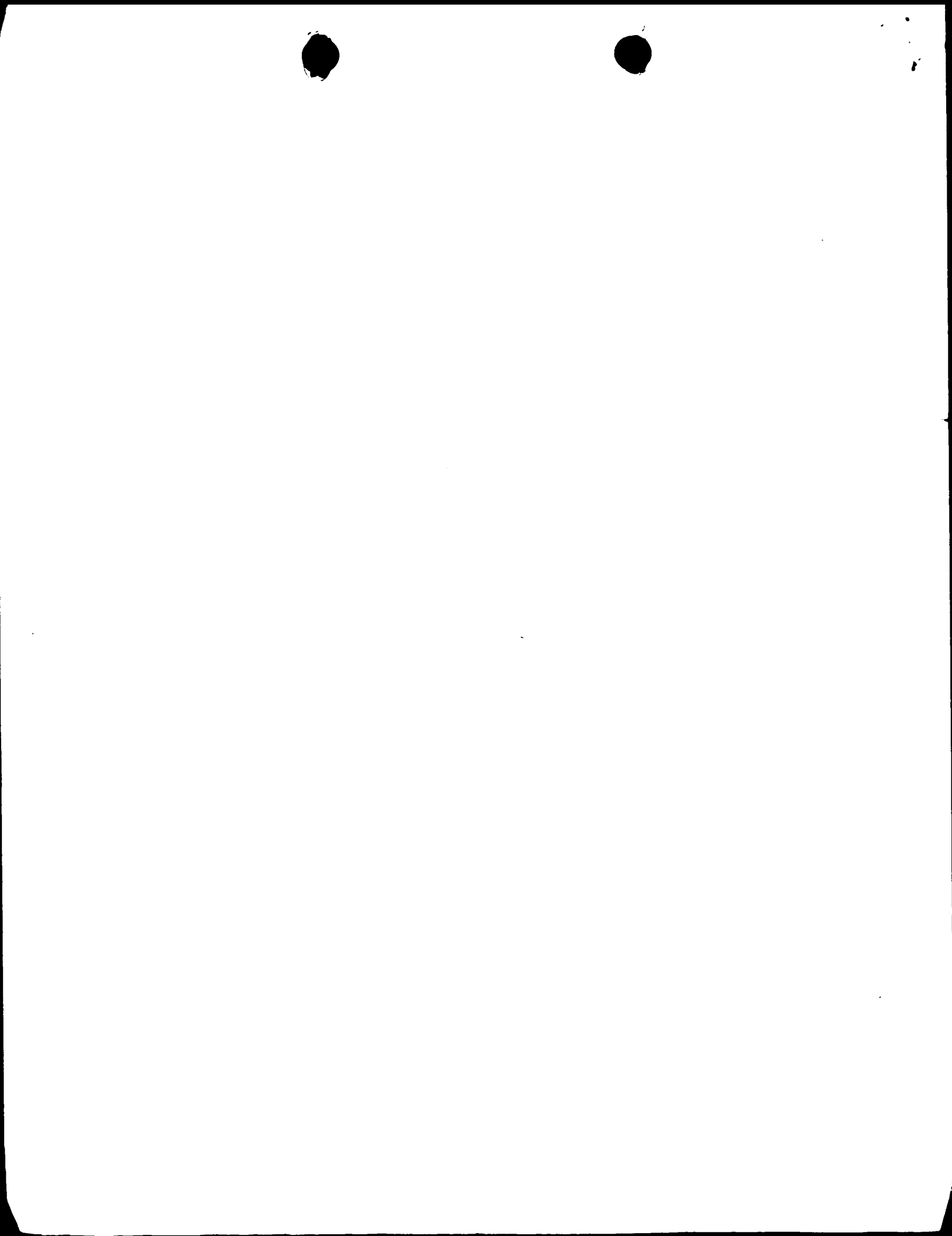
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/52 C07K14/37 C12P25/00 C12N15/80 C12N9/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
<input checked="" type="checkbox"/> Y	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5. Oktober 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiel 1 ---	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Y	M ROSE ET AL: "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli" GENE, Bd. 29, 1. Januar 1984, Seiten 113-124, XP002092104 in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 5 --- -/--	1-5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ALTSCHUL S F ET AL: "BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 215, 5. Oktober 1990, Seiten 403-410, XP000604562 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-5
A	WO 97 03208 A (BASF AG; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH) 30. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 39 ---	6-9, 14-16
A	EP 0 011 562 A (ANVAR) 28. Mai 1980 siehe Abbildung 5 ---	6,8,9,11
A	P. ZHOU ET AL., : "A system for gene cloning and manipulation in the yeast Candida glabrata" GENE, Bd. 142, 1994, Seiten 135-140, XP002106569 siehe Abbildung 1 ---	1
A	D'ENFERT C.: "Selection of multiple disruption events in Aspergillus fumigatus using the orotidine-5'-decarboxylase gene, pyrG, as a unique transformation marker." CURRENT GENETICS, Bd. 30 (1), 1996, Seite 76-82 XP002107254 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-11
A	BENITO ERNESTO P. ET AL.,: "Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of Mucor circinelloides OMPdecase-deficient mutants." MOLECULAR & GENERAL GENETICS , Bd. 248 (2), 1995, Seite 126-135 XP002107255 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-9, 11
A	S. PIREDDA AND C. GALLARDIN: "Development of a transformation system for the yeast Yamadazyma (Pichia) ohmeri" YEAST, Bd. 10, Nr. 12, 1994, Seiten 1601-1612, XP002107256 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,4,6-9, 12

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	R.M.J. BERGKAMP ET AL., : "Cloning and sequencing of the URA3 gene of Kluyveromyces marxianus CBS 6556" YEAST, Bd. 9, Nr. 6, 1993, Seiten 677-681, XP002107257 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,4, 8-10,14

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

1/EP 98/08382

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4420785 A	05-10-1995	CA 2186403 A	05-10-1995
		CN 1146781 A	02-04-1997
		WO 9526406 A	05-10-1995
		EP 0751995 A	08-01-1997
		JP 9510618 T	28-10-1997
		US 5821090 A	13-10-1998

WO 9703208 A	30-01-1997	DE 19525281 C	04-04-1996
		DE 19545468 A	21-08-1997
		CA 2223877 A	30-01-1997
		CN 1193356 A	16-09-1998
		EP 0839211 A	06-05-1998

EP 0011562 A	28-05-1980	FR 2441659 A	13-06-1980
		JP 55077889 A	12-06-1980
		US 4387162 A	07-06-1983

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36432
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08382		(81) Bestimmungsstaaten: CN, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1998 (18.12.98)			
(30) Prioritätsdaten: 198 01 120.2 15. Januar 1998 (15.01.98) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POMPEJUS, Markus [DE/DE]; Lerchenstrasse 72, D-67165 Waldsee (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo, 11, 4E, E-37001 Salamanca (ES). SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; Versalles, 7, E-37009 Salamanco (ES).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Title: OROTIDINE 5'-PHOSPHATE DECARBOXYLASE-GENE, GENE CONSTRUCT CONTAINING SAID GENE AND THE UTILIZATION THEREOF			
(54) Bezeichnung: OROTIDIN-5'-PHOSPHATDECARBOXYLASE-GEN, GENKONSTRUKT ENTHALTEND DIESES GEN UND SEINE VERWENDUNG			
(57) Abstract The invention relates to an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof, a gene construct containing said gene or the homologues thereof and the utilization of the same. The invention also relates to vectors or organisms containing an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof. In addition, the invention relates to a method for producing uracil auxotrophic microorganisms and to a method for introducing DNA in uracil auxotrophic microorganisms.			
(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen Verwendung. Die Erfindung betrifft ausserdem Vektoren oder Organismen enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen, Genkonstrukt enthaltend dieses Gen und seine Verwendung

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen
10 Verwendung. Die Erfindung betrifft außerdem Vektoren oder Organismen enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung
15 von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.

Vitamin B₂, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin B₂-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Juckreiz und Entzündungen in den Haut-
20 falten und ähnliche Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme auftreten. Vitamin B₂ hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminzusatz bei Vitaminmangel und als Futtermittelzusatz. Daneben wird es als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc. eingesetzt.
25

Die Herstellung von Vitamin B₂ erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell (siehe z.B. Kurth et al., 1996, Riboflavin, in:
30 Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, VCH Weinheim). Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei relativ kostspielige Ausgangsprodukte, wie z.B. D-Ribose, eingesetzt werden müssen. Eine Alternative zur chemischen Synthese
35 von Riboflavin ist die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Als Ausgangsstoffe dienen dabei nachwachsende Rohstoffe, wie Zucker oder pflanzliche Öle. Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et
40 al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983), aber auch Hefen, wie z.B. *Candida*, *Pichia* und *Saccharomyces* oder Bakterien, wie z.B. *Bacillus*, *Clostridien* oder *Corynebakterien* sind als Riboflavin-Produzenten beschrieben.

In der DE 44 20 785 wurden sechs Riboflavin-Biosynthesegene aus *Ashbya gossypii* beschrieben, sowie Mikroorganismen, die mit diesen Genen transformiert wurden und die Verwendung solcher Mikroorganismen zur Riboflavinsynthese.

- 5 Bisher werden Gene über die Marker *leu2* (Leucin-Auxotrophie), *thr4* (Threonin-Auxotrophie) oder *kan* (Kanamycin-Resistenz) in pilzliche Riboflavinproduzenten wie *Ashbya gossypii* eingebracht (WO 92/00379). In Hefen wird als weiterer Marker *met15* (Methionin-Auxotrophie, Cost et al., Yeast, Vol. 12, 1996: 939 -
10 941) beschrieben. Von Nachteil bei diesen Marker ist, daß entweder die Transformationseffizienz sehr gering ist und/oder aber zur Selektion ständig Antibiotika gegeben werden muß. In jedem Fall ist jedoch eine Gegenselektion auf den Verlust des Markers unter Erhalt der eingebrachten Gene im Mikroorganismen nicht oder
15 nur unter einem sehr hohen Aufwand möglich, so daß weitere Gene mit diesen Markern in der Regel nicht mehr in die Mikroorganismen eingebracht werden können. Es ist deshalb wünschenswert einen Selektionsmarker, der eine hohe Transformationseffizienz aufweist, leicht selektionierbar ist und eine Gegenselektion ermöglicht, zu haben.
20

- Das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen (= *URA3*-Gen) aus *Saccharomyces cerevisiae* ist einer der klassischen Marker, der die gewünschten Eigenschaften besitzt und mit dessen Hilfe Gene
25 in Mikroorganismen wie Hefen und Pilze transformiert werden können. In einer Reihe von Arbeiten wird die Isolierung art-spezifischer *URA3*-Gene bzw. die Isolierung des entsprechenden Gens aus Pilzen (= *pyrG*) sowie deren Sequenzen aus *Pichia stipitis*, *Candida boidinii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yamadazyma ohmeri*, *Candida maltosa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*,
30 *Aspergillus nidulans*, *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeana*, *Penicillium chrysogenum*, und *Aspergillus awamori* beschrieben (Appl. Environ. Microbiol., Vol. 60, No. 12, 1994 : 4245 - 4254, Nucl. Acids Res., Vol. 18, No. 23, 1990: 7183, J. Ferment. Bioeng., Vol. 73, No 4, 1992: 255 - 260, Yeast,
35 Vol. 9, 1993: 677 - 681, Yeast, Vol. 10, 1994: 1601 - 1612, Curr. Genet., Vol. 23, 1993: 205 - 210, Nucl. Acids Res., Vol. 16, No. 5, 1988: 2339, Curr. Genet., Vol. 16, 1989: 159 - 163, Gene, Vol. 61, 1987: 385 - 399, Gene, Vol. 116, 1992: 59- 67, Mol. Gen. Genet., Vol. 224, 1990: 269 - 278, Nucl. Acids Res., Vol. 16,
40 No. 16, 1988: 8177, Nucl. Acids Res., Vol. 18, No. 23, 1990: 7183 und Curr. Genet., Vol. 27, 1995: 536 - 540).

- Arbeiten von Rose et al. (Gene, Vol. 29, 1984: 113 - 124) zeigten, daß das *URA3*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* sogar eine
45 entsprechende Mutation (*pyrF*-Gen = *URA3*) in Prokaryonten wie *Escherichia coli* komplementieren kann und als Selektionsmarker sinnvoll verwendet werden kann.

Bei genetischen Arbeiten zur Riboflavinsynthese von *Ashbya gossypii* (Vitamin B2-Synthese) zeigte sich jedoch, daß das URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder das pyrF-Gen aus *Escherichia coli* keine Uracil auxotrophen *Ashbya gossypii*-Mutanten komplementieren können und deshalb diese Gene zur Klonierung von Genen in *Ashbya gossypii* nicht verwendet werden kann.

Es wurde deshalb versucht, da daß dem URA3-Gen oder pyrF-Gen entsprechende Gen aus *Ashbya gossypii* unbekannt ist, dies zu klonieren. Versuche zur Klonierung des *Ashbya*-Gens nach den in der Literatur beschriebenen Methoden über beispielsweise Hybridisierung mit URA3-Gen-Fragmenten oder über degenerierte Oligonukleotide auf Basis konservierter Aminosäuresequenzen verschiedener Orotidin-5'-phosphatdecarboxylasen und Screening einer "cDNA-library" mit diesen Oligonukleotiden und der PCR-Technik waren erfolglos (Bergkamp et al. *Yeast*, Vol. 9, 1993: 677 - 681, Piredda et al., *Yeast*, Vol. 10, 1994: 1601 - 1612, Benito et al., *Gene*, Vol. 116, 1992: 59 - 67 und Diaz-Minguez et al., *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 224, 1990: 269 - 278).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, deshalb einen leicht selektionierbaren, mit hoher Ausbeute transformierbaren und einfach gegenselektionierbaren Marker zur Verfügung zu stellen, der das Einbringen von Genen in Mikroorganismen ermöglicht.

Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäße Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen, gelöst.

Unter Homologe des erfindungsgemäßen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 80 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 90 % Homologie, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 % Homologie aufweisen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 1 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine vorteilhafterweise für das Einbringen eines oder mehrerer Gene jedoch erhalten bleiben sollte. Sollen mit Hilfe der SEQ ID NO: 1 und seiner Homologen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen jedoch Mutanten im Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen hergestellt werden, so werden nicht funktionelle Gene das heißt Gene, die zu enzymatisch inaktiven Proteinen führen, verwendet. Dabei werden vorteilhafterweise Sequenzen ver-

wendet, die Homologien zur SEQ ID NO: 1 oder seinen Homologen vorteilhaft am 3'- und 5'-Ende aufweisen.

Weiterhin sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise
5 pilzliche oder pflanzliche Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt von mindestens 70 %, besonders bevorzugt von mindestens 80 %, ganz
10 besonders bevorzugt von mindestens 90 % über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die
15 den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz
20 in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startkodon
25 so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert bevorzugt erhöht wird.

Bevorzugt läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus Mikroorganismen der Familie Metschnikowiaceae, besonders bevor-
30 zugt aus Mikroorganismen der Gattungen Eremothecium, Ashbya oder Nematospora, ganz besonders bevorzugt aus Mikroorganismen der Gattung und Art Eremothecium ashbyii oder Ashbya gossypii isolieren.

35 Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt sind die URA3-Gensequenzen SEQ ID No. 1 und seine Homologen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen
40 um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die
45 natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale

vor die Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die URA3-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein, wobei das oder die Gene auch inaktiviert sein können. Mit Hilfe dieses oder dieser inaktivierten Gene können im erfindungsgemäßen Verfahren Uracil-auxotrophe Mutanten erzeugt werden. Zum Einbringen weiterer Gene in einen Mikroorganismus sind im Genkonstrukt vorteilhafterweise weitere Gene enthalten. Diese Gene können innerhalb eines URA3-Genes liegen, wobei vorteilhaft eine intakte Kopie des URA3-Gens und/oder ein anderes selektierbares Gen wie leu2, thr4 oder kan im Konstrukt enthalten sein sollte, oder sie können außerhalb des URA3-Genes liegen. Auch im Falle eines intakten URA3-Gens im Genkonstrukt können noch weitere Marker wie die oben genannten gegebenenfalls zur Selektion im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -P_R- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Genkonstrukt können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Mikroorganismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können innerhalb oder außerhalb der Markergene wie ura3, leu2, thr4 oder kan inseriert sein. Prinzipiell können

alle Arten von Genen mit Hilfe des erfindungsgemäßen URA3-Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen in Mikroorganismen eingebracht werden. Vorteilhafterweise lassen sich regulatorische Gene wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, die über ihre enzymatische Aktivität in die Regulation eingreifen, oder ein oder mehrere oder alle Gene eines Biosyntheseweges wie die Gene der Riboflavinbiosynthese wie beispielsweise die rib-Gene oder Gene von Biosynthesewegen, die zu anderen Feinchemikalien, Sekundärmetaboliten oder Proteinen führen wie die Gene der Biotin-, Lysin-, Methionin-, Vitamin B12- oder Carotinoidbiosynthese, oder Gene, die zu Aroma-, Wuchs- oder Geruchsstoffen führen oder einzelne Gene für Enzyme wie Proteasen oder Lipasen über die URA3-Sequenz in Wirtsorganismen einbringen und exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Die eingebrachten Gene können einen eigenen Promotor haben oder aber unter der Regulation des Promotors der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seiner Homologen liegen.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 μ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

Vorteilhafterweise enthält das Genkonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 5
- 10 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Genkonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Genkonstrukt als Vektor bestehen.
- 15

- Als Wirtsorganismen für das erfindungsgemäße Genkonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen, tierische oder pflanzliche Zellen verwendet. Bevorzugt werden Pilze oder Hefen, besonders bevorzugt Pilze, ganz besonders bevorzugt Pilze der Familie Metschnikowiaceae wie *Eremothecium*, *Ashbya* oder *Nematospora* verwendet.
- 20
- 25

- Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen. Zur Erzeugung von Uracil auxotrophen Mutanten wird das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen beispielsweise durch Mutagenese so verändert, daß das durch das Gen codierte Protein inaktiviert wird. Dieses inaktivierte Gen wird anschließend in einen Mikroorganismus beispielsweise über Transformation oder Elektroporation eingeführt. Durch homologe Rekombination in den Mikroorganismen entstehen schließlich auxotrophe Mutanten, die über ihre Resistenz gegen 5-Fluororotsäure gescreent werden können (siehe Boeke et al., Mol. Gen. Genet., Vol. 197, 1984: 345 - 346).
- 30
- 35

- Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen (= URA3-Gen) defizienten Organismus bevorzugt einen Mikroorganismus einen Vektor einbringt, der ein intaktes URA3-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen vorteilhafterweise zusammen mit weiterer DNA vorzugsweise mit mindestens einem weiteren Gen enthält, und diesen Organismus auf oder in einem Kulturmedium kultiviert, das kein Uracil enthält. In diesem Medium können nur diese Organismen
- 40
- 45

wachsen, die den Vektor erhalten haben. Bevorzugt wird in diesem Verfahren als Vektor eine lineare DNA verwendet. Als Mikroorganismen werden in diesem Verfahren bevorzugt Pilze besonders der Familie Metschnikowiaceae wie *Eremothecium*, *Ashbya* oder
5 *Nematospora*, besonders bevorzugt Mikroorganismen der Gattung *Ashbya* verwendet.

Als Vektor kann auch ein beliebiges Plasmid (insbesondere aber ein Plasmid, das den Replikationsursprung des 2m Plasmids aus *S. cerevisiae* trägt) verwendet werden, das in der Zelle autonom repliziert, aber auch wie oben beschrieben ein lineares DNA-Fragment, das in das Genom des Wirtes integriert. Diese Integration kann über hetero- oder homologe Rekombination erfolgen. Bevorzugt wie erwähnt jedoch über homologe Rekombination (Steiner et al.,
15 *Genetics*, Vol. 140, 1995: 973 - 987).

Das erfindungsgemäße URA3-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen lassen sich vorteilhaft als Selektionsmarker im erfindungsgemäßen Verfahren verwenden. Bevorzugt lassen sich Gene
20 unter Verwendung dieses Selektionsmarkers Gene in *Ashbya gossypii* einbringen.

Von Vorteil ist weiterhin, daß man bei der Transformation von *Ashbya gossypii* mit Hilfe dieses Genes selektionieren kann, ohne
25 Fremd-DNA (d.h. DNA, die nicht aus *Ashbya gossypii* stammt) verwenden zu müssen.

Bei der Transformation von *Ashbya gossypii* mit dem Gen mit der SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen können beliebige weitere Gene
30 miteingebracht werden. Dadurch ist es möglich, Stämme zu konstruieren, die einzelne Gene oder mehrere Gene in weiteren Kopien entweder auf Plasmiden oder im Genom tragen.

Des weiteren ist es möglich, *Ashbya*-Stämme zu konstruieren, bei
35 denen chromosomale Kopien von Genen durch die Insertion des URA3 Gens mit der SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen zerstört wurden.

Ein besonderer Vorteil des AgURA3 Gens ist die Möglichkeit, den Marker mehrfach hintereinander im gleichen Stamm zu verwenden.
40 Wenn man 5' und 3' des Gens identische Nukleotidsequenzen in gleicher Orientierung (sogenannte direct repeats) setzt, kann man den AgURA3 Marker bei Bedarf durch Homologe Rekombination und Selektion auf Uracil- und FOA-haltigen Medium wieder entfernen und dann in einer weiteren Runde zusätzliche DNA mit Hilfe dieses
45 Gens einbringen. Ein weiterer Vorteil ist die deutlich höhere Transformationseffizienz im Vergleich zu den Markern *thr*, *leu* oder *kan*.

Im erfindungsgemäßen Verfahren enthält der Vektor als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavinsynthese. Unter Gene der Riboflavinsynthese sind solche Gene zu verstehen, die an der Synthese im gesamten Stoffwechsel von Riboflavinproduzenten wie
5 Ashbya beteiligt sind.

Beispiele:

Beispiel 1:

10

Herstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii* ATCC10895

Genomische DNA aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 wurde nach dem in
15 WO97/03208 beschriebenen Verfahren präpariert. Die genomische Genbank, ausgehend von dieser DNA, wurde nach der in Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press bzw. in F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons beschriebenen Me-
20 thode in pRS314 und in YEp351 (Hill et al., Yeast, Vol. 2, 1986: 163 - 167) erstellt. Wie beispielsweise WO97/03208 zu entnehmen ist, sind auch andere Plasmide wie Plasmide der pRS-Reihe (Sikorski und Hieter, Genetics, 1989: 19-27) oder Cosmiden, wie z.B. SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, USA) für die Herstellung
25 der Genbank geeignet.

Beispiel 2:

Es wurde zunächst versucht das Gen für die Orotidin-5'-Phosphat-
30 decarboxylase (= OMP-DC) aus *Ashbya gossypii* über eine funktionelle Komplementation einer entsprechenden URA3 auxotrophen Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren.

Dazu wurde eine Genbank von genomischer *Ashbya gossypii* DNA in
35 pRS314 erstellt (wie in Beispiel 1 beschrieben). Mit dieser DNA wurde der *S. cerevisiae* Stamm MW3317-21A (Genotyp: MAT α , trp1, ade8 Δ Kpn, ura3-52, hom3-10, met13, met4, ade2, his3-Kpn, siehe z.B. Kramer et al., Mol. Cell. Biol. 9, 1989: 4432-4440), nach der Lithiumacetat-Methode (siehe z.B. Kramer et al., Mol. Cell.
40 Biol. 9, 1989: 4432-4440) transformiert. Es wurde kein Klon erhalten, bei dem die genomische Deletion des ura3 Gens des *S. cerevisiae*- Stammes durch ein Genfragment aus *Ashbya* komplementiert wurde.

45

Auch der Versuch über eine funktionelle Komplementation in einer pyrF-Mutante von *E. coli* das URA3 Gen von *Ashbya gossypii* zu klonieren schlug fehl.

5 Beispiel 3:

Auch ein Versuch, das OMP-DC-Gen aus *Ashbya gossypii* über Hybridisierung mit einem Fragment des entsprechenden Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren, gelang nicht.

10

Dazu wurde das komplette URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank entry yscodcd) als Sonde (1,1 kb Länge) verwendet, um eine genomische Cosmid-Genbank von *Ashbya gossypii* (siehe Beispiel 1) zu screenen. Der Versuch wurde wie in Sambrook, J. et

- 15 al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons beschrieben durchgeführt, wobei Hybridisierungstemperaturen von 52°C bis 68°C verwendet wurden. Es konnten keine Klone in der Genbank identifiziert werden, die ein positives Signal mit dem URA3-Gen aus *S. cerevisiae* als Sonde lieferten.

Beispiel 4:

- 25 Im nächsten Ansatz wurde die Klonierung des Gens für OMP-DC aus *Ashbya gossypii* über Amplifikation von Genfragmenten mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden und der PCR-Technik versucht.

- Für diesen Versuch wurden die bekannten Aminosäuresequenzen der
30 verschiedenen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylasen aus den folgenden Organismen miteinander verglichen und Bereiche ausgewählt, die in allen Enzymen höchstmöglich konserviert sind:

- Aspergillus niger (Acc. number: P07817)
35 Aspergillus nidulans (Acc. number: P10652)
Schizosaccharomyces pombe (Acc. number: P14965)
Penicillium chrysogenum (Acc. number: P09463)
Kluyveromyces lactis (Acc. number: P07922)
Candida albicans (Acc. number: P13649)
40 Neurospora crassa (Acc. number: P05035)
Ustilago maydis (Acc. number: P15188)
Saccharomyces cerevisiae (Acc. number: P03962)
Drosophila melanogaster (Acc. number: Q01637)
Mouse (Acc. number: P13439)
45 Human (Acc. number: P11172)

Die in den Klammer angegebenen Nummern stammen aus der SWISS&PIR-Translated Datenbank Release 103.

Auf Basis dieser Informationen wurden degenerierte Oligonukleotide
5 synthetisiert.

Unter degenerierten Oligonukleotiden versteht man Oligonukleotide, bei denen während der Synthese an mehreren Positionen Mischungen von Nukleotiden eingebaut wurden.

10

R steht dabei für G oder A, Y steht dabei für C oder T, W steht dabei für A oder T, M steht dabei für A oder C, K steht dabei für G oder T, S steht dabei für C oder G, H steht dabei für A, C oder T, V steht dabei für A, C oder G, B steht dabei für C, G oder T,
15 D steht dabei für A, G oder T, N steht dabei für G,A,T oder C.

Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

URA3-A: 5'-YTNGGNCNTAYATHGTGY-3'
20 URA3-B: 5'-TAYTGYTGCCNARYTTRTCNCC-3'
URA3-C: 5'-TTYITNATHHTTYGARGAYMGNAARTT-3'
URA3-D: 5'-GCNARNARNARNARNCCNC-3'

Mit diesen Oligonukleotiden als Primer wurden PCR Reaktionen
25 durchgeführt mit genomischer DNA von *Ashbya gossypii* als Matrize verwendet.

Es wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

30 URA3-A + URA3-B; URA3-A + URA3-D; URA3C + URA3-B and URA3-C + URA3-D.

Folgende Hybridisierungstemperaturen wurden verwendet:

35 52 °C, 48 °C, 44 °C, 40 °C und 37 °C.

Die aus den PCR-Reaktionen entstandenen Produkte wurden nach üblichen Methoden in den Vektor pGEMT (Promega) kloniert und sequenziert. Es konnten keine Fragmente amplifiziert werden, die
40 Homologie zu bekannten oben genannten OMP-DC Genen zeigten.

Beispiel 5:

Wie in DE 44 20 785 A1 (Beispiel 1) beschrieben wurden eine cDNA-
45 Bank von *Ashbya gossypii* erstellt.

Beispiel 6:

Analyse von Nukleinsäuresequenzen der Genbank

- 5 Von E.coli Klonen, die die in Beispiel 5 beschriebene Genbank von Ashbya gossypii enthalten, wurden Einzelklone selektiert. Nach üblichen Methoden wurden die Zellen in geeigneten Medien (z.B. Luria-Broth mit 100 mg/l Ampicillin) kultiviert und Plasmid-DNA aus diesen Zellen isoliert.
- 10 Es wurde Oligonukleotide, die im Vektoranteil hybridisieren als Primer für die Sequenzierung der cDNA Klone verwendet. Dabei wurden Fragmente der klonierten cDNAs erfasst. Die Sequenzen wurden wie in Beispiel 7 beschrieben analysiert.

15

Beispiel 7:

- Es wurde eine Computer-unterstützte Analyse der gefundenen Nukleotidsequenzen über Sequenzvergleiche neu identifizierter
- 20 Sequenzen mit bestehenden DNA und Proteindatenbanken mit Hilfe folgender Algorithmen z.B. mit BLAST Algorithmen (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), dem Clustal Algorithmus mit Hilfe der PAM250 Gewichtungstabelle oder dem Wilbur-Lipman DNA alignment Algorithmus (wie z.B. in dem Programmpaket MegAlign
- 25 3.06 der Firma DNASTAR implementiert) durchgeführt. Auf diesem Weg konnten Ähnlichkeiten der neu entdeckten Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen entdeckt und neue Gene oder Teilsequenzen von Genen in ihrer Funktion beschrieben werden.

30 Beispiel 8:

Identifikation von E. coli Klonen, die das Gen für OMP-DC aus Ashbya gossypii (AgURA3) tragen.

- 35 Nach Untersuchung einer Vielzahl von Klonen wie in Bsp. 6 und 7 (> 100 Klone) beschrieben wurde eine Sequenz gefunden, die Ähnlichkeiten zu den bekannten OMP-DC Genen zeigte. Mit dieser homologen Sonde wurde dann die genomische Ashbya Genbank (siehe Beispiel 1) nochmals gescreent und es konnten Klone bzw. Cosmide
- 40 identifiziert werden, die ein spezifisches positives Signal ergaben und ein gemeinsames 1,3 kb XhoI-EcoRI-Fragment trugen. Die Sequenzierung der Klone ergab die Sequenz wie in SEQ ID NO: 1 beschrieben. Die Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zu bekannten URA3 Genen und codiert für ein ca. 29246 Dalton großes Protein.

45

Beispiel 9:

Disruption der chromosomalen Kopie des AgURA3 Gens mit Anti-biotika-Resistenzgenen

5

Unter Disruption eines Gens versteht man die Zerstörung der Funktionalität einer genomischen Kopie des Gens entweder durch (a) Entfernen eines Teiles der Gensequenz, oder durch (b) der Unterbrechung des Gens durch Einfügung eines Stückes Fremd-DNA in
10 das Gen oder durch (c) Ersatz eines Teil des Gens durch Fremd-DNA. Die verwendete Fremd-DNA ist beliebig, bevorzugt aber ein Gen, das Resistenz gegen eine beliebige Chemikalie bewirkt. Zur Disruption von Genen können beliebige Resistenzgene verwendet werden.

15

Zur Disruption des AgURA3-Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895 wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus Tn903, das unter Kontrolle des TEF-Promotors von *Ashbya gossypii* (siehe Yeast 10, S. 1793-1808, 1994 oder WO92/00379) verwendet. Das Gen ist 5'
20 und 3' von mehreren Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen flankiert, so daß eine Kassette aufgebaut werden konnte, die beliebige Konstruktionen von Gen-Disruptionen mit üblichen Methoden der *in vitro* Manipulation von DNA ermöglichen.

25 Das interne 370 bp PstI-KpnI Fragment von AgURA3 (Position 442 - 892 in der Sequenz SEQ ID NO: 1) wurde durch eine wie oben skizzierte Resistenzkassette ersetzt. Das erhaltene Konstrukt erhielt den Namen *ura3::G418*. Das erhaltene Plasmid läßt sich nach Transformation in *E.coli* vermehren. Das XhoI-SphI-Fragment des Kon-
30 struktes *ura3::G418* (siehe Figur 1) wurde über Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgender Elution der DNA aus dem Gel (siehe Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619, 1979) aufgereinigt und zur Transformation von *Ashbya gossypii* eingesetzt. Figur 1 zeigt in Abbildung A eine Restriktionskarte des kodierenden Bereichs
35 des AgURA3-Gens und der 5'- und 3'-nicht translatierten Regionen (= 5'-UTR und 3'-UTR). Abbildung B zeigt die Situation nach Insertion der oben beschriebenen Kanamycin-Resistenzkassette (= TEF-kanR).

40 Das Fragment wurde entweder über Protoplastentransformation (Gene 109, 99-105, 1991) oder aber bevorzugt durch Elektroporation (BioRad Gene Pulser, Bedingungen: Küvetten mit Spaltbreite 0,4 mm, 1500V, 25µF, 100Ω) in *Ashbya gossypii* transformiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf G418-haltigem Fest-
45 medium (WO 97/03208).

Erhaltene G418-resistente Klone wurden mit üblichen Methoden der PCR und Southern-Blot Analyse (Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press bzw. in F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons) daraufhin untersucht, ob die genomische Kopie des AgURA3 Gens tatsächlich zerstört wurde. Klone, deren AgURA3 Gen zerstört wurde, sind Uracil- auxotroph und resistent gegen 1 mg/ml 5'-Fluoro-Orotsäure (FOA).

10 Beispiel 10:

Disruption der chromosomalen Kopie des AgURA3 Gens ohne Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen

- 15 Ein besonderer Vorteil der Verwendung von URA3 Genen ist die Möglichkeit sowohl auf An- als auch auf Abwesenheit des Gens zu selektionieren. Man kann mit FOA Mikroorganismen screenen, die ein funktionell inaktiviertes URA3 Gen besitzen, und mit Hilfe der Selektion auf Uracil- Prototrophie auf ein funktionell
20 aktives URA3 Gen selektionieren.

Zur Disruption der genomischen Kopie des URA3 Gens wurde einfachheitshalber ein internes Fragment (= PstI-Fragment) des URA3 Gens aus dem kodierenden Bereich des Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1
25 deletiert (Position 442 bis 520 in der Sequenz SEQ ID NO: 1). Die Transformation von *Ashbya gossypii* mit diesem deletierten ura3-Fragment wurde wie in Beispiel 10 beschrieben durchgeführt. Anstelle der Deletion von Teilbereichen des Gens können prinzipiell auch alle anderen Methoden zur Inaktivierung des Gens wie
30 Mutationen über Insertionen, Duplikationen, Reversionen, Austausch mehrerer Nukleotide oder Punktmutationen verwendet werden. Punktmutationen sind weniger bevorzugt, da sie leicht revertieren.

- 35 Die Selektion der Transformanten wurde durch Resistenz gegen FOA durchgeführt. Im Gegensatz zu Wild-Typ-Klonen sind Klone, die eine Disruption des AgURA3 Gens tragen sind resistent gegen 1 mg/ml FOA.

40

45

Beispiel 11:

Verwendung des AgURA3 Gens zum Einbringen weiterer DNA in *A. gossypii*.

5

Das in WO 97/03208 beschriebene Isocitratlyasegen wurde mit Hilfe des Plasmids pAG100, wie in WO 97/03208 (Beispiel 4 und 5) beschrieben, in AgURA3-Disruptionsmutanten *A. gossypii* (siehe Beispiel 9 und 10) eingebracht, wobei als Selektionsmarker in 10 *A. gossypii* anstelle der beschriebenen G418-Resistenz das AgURA3 Gen verwendet wurde.

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID
5 NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur
Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen.
2. Homologe nach Anspruch 1, deren durch sie codierten Gen-
produkte funktionell sind.
- 10 3. Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID
NO: 1 oder seine Homologen, dadurch gekennzeichnet, daß das
Gen oder seine Homologen aus *Ashbya gossypii* stammt.
- 15 4. Aminosäuresequenzen codiert durch ein Gen oder seine Homologe
gemäß den Ansprüchen 1 bis 3.
5. Aminosäuresequenzen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,
daß es sich um enzymatisch aktive Proteine handelt.
- 20 6. Genkonstrukt enthaltend ein Orotidin-5'- Phosphatdecarboxy-
lase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen
nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei das Gen oder seine
Homologen funktionell mit einem oder mehreren Regulations-
25 signalen verknüpft ist.
7. Genkonstrukt nach Anspruch 6, deren Genexpression durch die
Regulationssignale erhöht wird.
- 30 8. Vector enthaltend ein Genkonstrukt gemäß Anspruch 6 oder 7.
9. Mikroorganismus enthaltend mindestens ein Genkonstrukt gemäß
Anspruch 6 oder 7.
- 35 10. Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikro-
organismen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Orotidin-5'-
Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder
seine Homologen gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 so verändert,
daß das durch das Gen codierte Protein inaktiv ist, und daß
40 man dieses veränderte Gen in die Mikroorganismen einführt
und über homologe Rekombination in das Genom der Organismen
integriert und anschließend diese Mikroorganismen auf
5-Fluororotsäureresistenz selektioniert.
- 45 11. Verfahren zum Einbringen von DNA in Mikroorganismen, dadurch
gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphat-
decarboxylase-Gen defizienten Mikroorganismus einen Vector

einbringt, der ein intaktes Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 zusammen mit mindestens einem weiteren Gen enthält, und diesen Mikroorganismus auf oder in
5 einem Kulturmedium ohne Uracil anzieht.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Vector eine lineare DNA verwendet wird.

10 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienter Mikroorganismus ein *Ashbya gossypii* Stamm verwendet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet,
15 daß als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavin-synthese in den Mikroorganismus eingebracht wird.

15. Verwendung einer Gen-Sequenz oder seiner Homologen gemäß Anspruch 1 bis 3 als Selektionsmarker.

20

16. Verwendung nach Anspruch 15 in *Ashbya gossypii*.

25

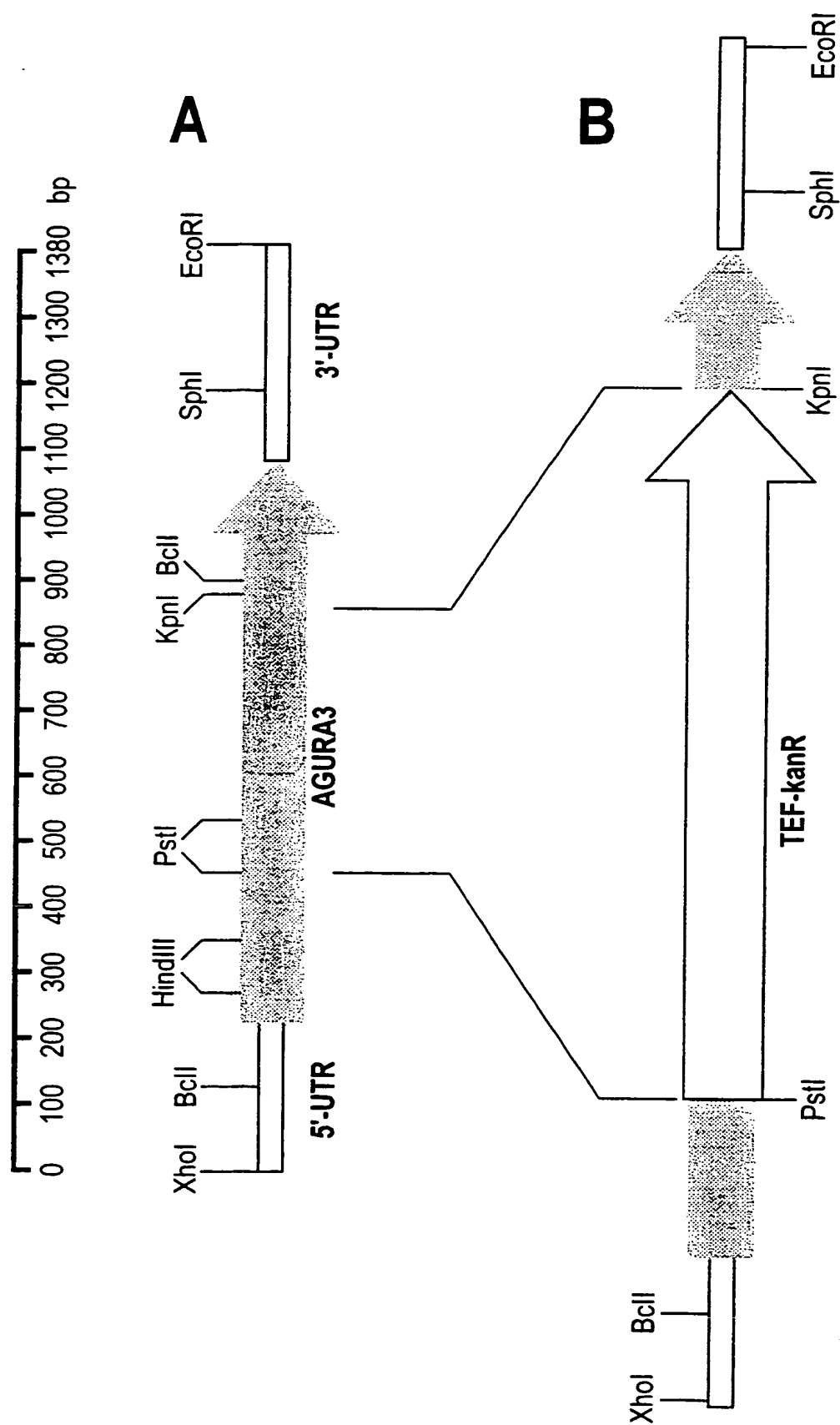
30

35

40

45







SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) ANMELDETITEL: Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen,
Genkonstrukt enthaltend dieses Gen und seine Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1380 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: ura3

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 210..1013

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..199



1

2

3

4

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 1014..1380

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTCGAGCAAC TCATTGGAAG CCCTTCGCAA ACGACCTCTA TATCTCGTCT CAAGTTCCTA	60
CTATCATGTA TGCTGTCACT ACAGAAAAAT TTTTGTCTAT AGCTGGCAAG AAGCACATCA	120
CATACATTCT GATGGTGTAG GCTCCACATC ACAGTAAGCA TTTGTATAAG GCTGATCACA	180
TAGGGTGCTA CCGACCTAGC CATTGCCAC ATG TCA ACG AAA TCT TAC GCA GAA	233
Met Ser Thr Lys Ser Tyr Ala Glu	
1 5	
AGG GCC AAG GCA CAC AAT TCG CCA GTT GCT AGA AAG CTT CTG GCA TTG	281
Arg Ala Lys Ala His Asn Ser Pro Val Ala Arg Lys Leu Leu Ala Leu	
10 15 20	
ATG CAC GAG AAG AAA ACC AAT CTC TGC GCT TCC CTT GAT GTG CGG ACG	329
Met His Glu Lys Lys Thr Asn Leu Cys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr	
25 30 35 40	
TCT AGA AAG CTT CTG GAG CTA GCA GAC ACG CTG GGA CCG CAC ATT TGT	377
Ser Arg Lys Leu Leu Glu Leu Ala Asp Thr Leu Gly Pro His Ile Cys	
45 50 55	
CTG CTG AAG ACA CAT GTC GAC ATA CTG ACG GAC TTC GAC ATC GAG ACG	425
Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile Leu Thr Asp Phe Asp Ile Glu Thr	
60 65 70	
ACA GTC AAG CCG CTG CAG CAG CTT GCG GCT AAG CAC AAC TTC ATG ATC	473
Thr Val Lys Pro Leu Gln Gln Leu Ala Ala Lys His Asn Phe Met Ile	
75 80 85	
TTC GAG GAC CGC AAG TTC GCT GAC ATT GGC AAC ACG GTT AAG CTG CAG	521
Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln	
90 95 100	
TAC TCC TCC GGC GTG TAC CGT ATC GCG GAG TGG GCG GAT ATT ACC AAT	569
Tyr Ser Ser Gly Val Tyr Arg Ile Ala Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn	
105 110 115 120	
GCA CAC GGC GTC ACC GGC CCC GGT GTG ATA GCC GGG CTG AAG GAG GCT	617
Ala His Gly Val Thr Gly Pro Gly Val Ile Ala Gly Leu Lys Glu Ala	
125 130 135	
GCG AAA CTG GCC TCA CAG GAA CCC AGG GGG TTG CTG ATG CTG GCA GAG	665
Ala Lys Leu Ala Ser Gln Glu Pro Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu	
140 145 150	



CTC	TCT	TCT	CAG	GGC	TCT	TTG	GCG	CGC	GGA	GAC	TAT	ACC	GCG	GGC	GTC	713
Leu	Ser	Ser	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ala	Gly	Val	
		155					160					165				
GTT	GAA	ATG	GCG	AAG	CTG	GAC	GAA	GAC	TTT	GTG	ATC	GGG	TTC	ATC	GCG	761
Val	Glu	Met	Ala	Lys	Leu	Asp	Glu	Asp	Phe	Val	Ile	Gly	Phe	Ile	Ala	
	170					175				180						
CAG	CGT	GAC	ATG	GGT	GGG	CGT	GCA	GAC	GGC	TTT	GAC	TGG	CTC	ATC	ATG	809
Gln	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Arg	Ala	Asp	Gly	Phe	Asp	Trp	Leu	Ile	Met	
185				190					195						200	
ACC	CCG	GGG	GTT	GGC	CTG	GAC	GAC	AAA	GGA	GAC	GGC	CTG	GGC	CAG	CAG	857
Thr	Pro	Gly	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Asp	Gly	Leu	Gly	Gln	Gln	
			205					210						215		
TAC	CGC	ACG	GTG	GAT	GAG	GTC	GTC	AGC	GAC	GGT	ACC	GAT	GTG	ATC	ATT	905
Tyr	Arg	Thr	Val	Asp	Glu	Val	Val	Ser	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Ile	Ile	
		220					225					230				
GTT	GGC	AGA	GGG	CTC	TTT	GAC	AAG	GGA	AGA	GAC	CCC	AAG	GTC	GAG	GGT	953
Val	Gly	Arg	Gly	Leu	Phe	Asp	Lys	Gly	Arg	Asp	Pro	Lys	Val	Glu	Gly	
	235					240					245					
GCC	CGC	TAC	CGC	AAG	GCC	GGT	TGG	GAG	GCT	TAC	TTG	CGC	CGT	ATG	GGC	1001
Ala	Arg	Tyr	Arg	Lys	Ala	Gly	Trp	Glu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Arg	Met	Gly	
	250					255					260					
GAG	ACT	TCG	TAGTCTATCG	CTGGCGCCCA	CAGTATATAG	GCGGATTCCA										1050
Glu	Thr	Ser														
265																
CCGCCGATTA	CCATCTCAGC	AACCTTTTTG	TAATTATATG	CCCCTATTGC	CCTTATTTCC											1110
GAGCTGGTGC	CGGGATCGGT	TTATAGACGG	GCAACAAGTT	GATACTTTGT	TCAGTAGCAT											1170
GCATCCAACA	CTTGCAGGCT	TGGGGTGTGG	AAGGCCTCGC	CGCGGATAAT	TCGTATTACC											1230
CGCACTTCGT	GAAGTATTGC	TTTATGAAAA	ATCTTCACTT	TGGGCTAACT	AGAGCCATAA											1290
CTCGACACAA	GCCCCTTCCT	ACACACTTCG	AGCTGGGACT	AAAGTGACAA	CGAATAGCAA											1350
ATAATTAGCA	AATATGGATG	CGTTGAATTC														1380

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 267 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Met	Ser	Thr	Lys	Ser	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Lys	Ala	His	Asn	Ser	Pro	1	5	10	15
Val	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Met	His	Glu	Lys	Lys	Thr	Asn	Leu	20	25	30	
Cys	Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Arg	Thr	Ser	Arg	Lys	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	35	40	45	
Asp	Thr	Leu	Gly	Pro	His	Ile	Cys	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Val	Asp	Ile	50	55	60	
Leu	Thr	Asp	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr	Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Gln	Gln	Leu	65	70	75	80
Ala	Ala	Lys	His	Asn	Phe	Met	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Lys	Phe	Ala	Asp	85	90	95	
Ile	Gly	Asn	Thr	Val	Lys	Leu	Gln	Tyr	Ser	Ser	Gly	Val	Tyr	Arg	Ile	100	105	110	
Ala	Glu	Trp	Ala	Asp	Ile	Thr	Asn	Ala	His	Gly	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	115	120	125	
Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Gln	Glu	Pro	130	135	140	
Arg	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	145	150	155	160
Arg	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Met	Ala	Lys	Leu	Asp	Glu	165	170	175	
Asp	Phe	Val	Ile	Gly	Phe	Ile	Ala	Gln	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Arg	Ala	180	185	190	
Asp	Gly	Phe	Asp	Trp	Leu	Ile	Met	Thr	Pro	Gly	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	195	200	205	
Lys	Gly	Asp	Gly	Leu	Gly	Gln	Gln	Tyr	Arg	Thr	Val	Asp	Glu	Val	Val	210	215	220	
Ser	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Ile	Ile	Val	Gly	Arg	Gly	Leu	Phe	Asp	Lys	225	230	235	240
Gly	Arg	Asp	Pro	Lys	Val	Glu	Gly	Ala	Arg	Tyr	Arg	Lys	Ala	Gly	Trp	245	250	255	
Glu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Arg	Met	Gly	Glu	Thr	Ser						260	265		



2
1
1
1

1
1
1
1

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/52, C07K 14/37, C12P 25/00, A3 C12N 15/80, 9/88		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36432
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08382 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1998 (18.12.98) (30) Prioritätsdaten: 198 01 120.2 15. Januar 1998 (15.01.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POMPEJUS, Markus [DE/DE]; Lerchenstrasse 72, D-67165 Waldsee (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo, 11, 4E, E-37001 Salamanca (ES). SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; Versailles, 7, E-37009 Salamanca (ES). (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CN, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 19. August 1999 (19.08.99)
(54) Title: OROTIDINE 5'-PHOSPHATE DECARBOXYLASE-GENE, GENE CONSTRUCT CONTAINING SAID GENE AND THE UTILIZATION THEREOF (54) Bezeichnung: OROTIDIN-5'-PHOSPHATDECARBOXYLASE-GEN, GENKONSTRUKT ENTHALTEND DIESES GEN UND SEINE VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention relates to an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof, a gene construct containing said gene or the homologues thereof and the utilization of the same. The invention also relates to vectors or organisms containing an orotidine 5'-phosphate decarboxylase-gene having the sequence SEQ ID No. 1 or the homologues thereof. In addition, the invention relates to a method for producing uracil auxotrophic microorganisms and to a method for introducing DNA in uracil auxotrophic microorganisms.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen Verwendung. Die Erfindung betrifft ausserdem Vektoren oder Organismen enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/52 C07K14/37 C12P25/00 C12N15/80 C12N9/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5 October 1995 cited in the application see example 1	1-5
Y	M ROSE ET AL: "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli" GENE, vol. 29, 1 January 1984, pages 113-124, XP002092104 cited in the application see figure 5	1-5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1999

Date of mailing of the international search report

12/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/08382

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALTSCHUL S F ET AL: "BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 215, 5 October 1990, pages 403-410, XP000604562 cited in the application see the whole document ---	1-5
A	WO 97 03208 A (BASF AG; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH) 30 January 1997 cited in the application see page 1, line 1 - page 5, line 39 ---	6-9, 14-16
A	EP 0 011 562 A (ANVAR) 28 May 1980 see figure 5 ---	6,8,9,11
A	P. ZHOU ET AL., : "A system for gene cloning and manipulation in the yeast <i>Candida glabrata</i> " GENE, vol. 142, 1994, pages 135-140, XP002106569 see figure 1 ---	1
A	D'ENFERT C.: "Selection of multiple disruption events in <i>Aspergillus fumigatus</i> using the orotidine-5'-decarboxylase gene, <i>pyrG</i> , as a unique transformation marker." CURRENT GENETICS, vol. 30 (1), 1996, page 76-82 XP002107254 see the whole document ---	1,2,4-11
A	BENITO ERNESTO P. ET AL.,: "Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of <i>Mucor circinelloides</i> OMPdecase-deficient mutants." MOLECULAR & GENERAL GENETICS , vol. 248 (2), 1995, page 126-135 XP002107255 see the whole document ---	1,2,4-9, 11
A	S. PIREDDA AND C. GALLARDIN: "Development of a transformation system for the yeast <i>Yamadazyma (Pichia) ohmeri</i> " YEAST, vol. 10, no. 12, 1994, pages 1601-1612, XP002107256 cited in the application see the whole document ---	1,4,6-9, 12
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08382

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>R.M.J. BERGKAMP ET AL., : "Cloning and sequencing of the URA3 gene of Kluyveromyces marxianus CBS 6556" YEAST, vol. 9, no. 6, 1993, pages 677-681, XP002107257 cited in the application see the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1,4, 8-10,14</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/08382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4420785 A	05-10-1995	CA 2186403 A	05-10-1995
		CN 1146781 A	02-04-1997
		WO 9526406 A	05-10-1995
		EP 0751995 A	08-01-1997
		JP 9510618 T	28-10-1997
		US 5821090 A	13-10-1998
WO 9703208 A	30-01-1997	DE 19525281 C	04-04-1996
		DE 19545468 A	21-08-1997
		CA 2223877 A	30-01-1997
		CN 1193356 A	16-09-1998
		EP 0839211 A	06-05-1998
EP 0011562 A	28-05-1980	FR 2441659 A	13-06-1980
		JP 55077889 A	12-06-1980
		US 4387162 A	07-06-1983

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/52 C07K14/37 C12P25/00 C12N15/80 C12N9/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5. Oktober 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiel 1 ---	1-5
Y	M ROSE ET AL: "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli" GENE, Bd. 29, 1. Januar 1984, Seiten 113-124, XP002092104 in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 5 --- -/--	1-5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"-Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"-Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ALTSCHUL S F ET AL: "BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 215, 5. Oktober 1990, Seiten 403-410, XP000604562 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-5
A	WO 97 03208 A (BASF AG; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH) 30. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 39 ---	6-9, 14-16
A	EP 0 011 562 A (ANVAR) 28. Mai 1980 siehe Abbildung 5 ---	6,8,9,11
A	P. ZHOU ET AL., : "A system for gene cloning and manipulation in the yeast Candida glabrata" GENE, Bd. 142, 1994, Seiten 135-140, XP002106569 siehe Abbildung 1 ---	1
A	D'ENFERT C.: "Selection of multiple disruption events in Aspergillus fumigatus using the orotidine-5'-decarboxylase gene, pyrG, as a unique transformation marker." CURRENT GENETICS, Bd. 30 (1), 1996, Seite 76-82 XP002107254 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-11
A	BENITO ERNESTO P. ET AL.,: "Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of Mucor circinelloides OMPdecase-deficient mutants." MOLECULAR & GENERAL GENETICS , Bd. 248 (2), 1995, Seite 126-135 XP002107255 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-9, 11
A	S. PIREDDA AND C. GALLARDIN: "Development of a transformation system for the yeast Yamadazyma (Pichia) ohmeri" YEAST, Bd. 10, Nr. 12, 1994, Seiten 1601-1612, XP002107256 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,4,6-9, 12

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>R.M.J. BERGKAMP ET AL., : "Cloning and sequencing of the URA3 gene of Kluyveromyces marxianus CBS 6556" YEAST, Bd. 9, Nr. 6, 1993, Seiten 677-681, XP002107257 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----</p>	1,4, 8-10,14

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08382

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4420785	A	05-10-1995	CA	2186403 A	05-10-1995
			CN	1146781 A	02-04-1997
			WO	9526406 A	05-10-1995
			EP	0751995 A	08-01-1997
			JP	9510618 T	28-10-1997
			US	5821090 A	13-10-1998

WO 9703208	A	30-01-1997	DE	19525281 C	04-04-1996
			DE	19545468 A	21-08-1997
			CA	2223877 A	30-01-1997
			CN	1193356 A	16-09-1998
			EP	0839211 A	06-05-1998

EP 0011562	A	28-05-1980	FR	2441659 A	13-06-1980
			JP	55077889 A	12-06-1980
			US	4387162 A	07-06-1983

REPLACEMENT
ART 34/1977

We claim:

1. An orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the
5 sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs which have at least 80%
homology with the sequence SEQ ID NO: 1.
2. A homolog as claimed in claim 1, whose gene product encoded
thereby is functional.
- 10 3. An orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the
sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs, wherein the gene or
its homologs derives from *Ashbya gossypii*.
- 15 4. An amino-acid sequence encoded by a gene or its homologs as
claimed in any of claims 1 to 3.
5. An amino-acid sequence as claimed in claim 4, which comprises
an enzymatically active protein.
- 20 6. A gene construct comprising an orotidine-5'-phosphate
decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its
homologs as claimed in any of claims 1 to 3, where the gene
or its homologs is functionally linked to one or more
25 regulatory signals.
7. A gene construct as claimed in claim 6, whose gene expression
is increased by the regulatory signals.
- 30 8. A vector comprising a gene construct as claimed in claim 6 or
7.
9. A microorganism comprising at least one gene construct as
claimed in claim 6 or 7.
- 35 10. A process for producing uracil-auxotrophic microorganisms,
which comprises modifying an orotidine-5'-phosphate
decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its
homologs as claimed in any of claims 1 to 3 in such a way
40 that the protein encoded by the gene is inactive, and this
modified gene being introduced into the microorganisms and
integrated by homologous recombination into the genome of the
organisms, and subsequently these microorganisms being
selected for resistance to 5-fluoroorotic acid.

11. A process for inserting DNA into microorganisms, which comprises inserting a vector which comprises an intact orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene having the sequence SEQ ID NO: 1 or its homologs as claimed in any of claims 1 to 3, together with at least one other gene, into a microorganism which is deficient in orotidine-5'-phosphate decarboxylase genes, and cultivating this microorganism on or in a culture medium without uracil.
12. A process as claimed in claim 11, wherein a linear DNA is used as vector.
13. A process as claimed in claim 11 or 12, wherein an *Ashbya gossypii* strain is used as microorganism deficient in orotidine-5'-phosphate decarboxylase genes.
14. A process as claimed in any of claims 11 to 13, wherein at least one gene of riboflavin synthesis is inserted as other gene into the microorganism.
15. The use of a gene sequence or its homologs as claimed in any of claims 1 to 3 as selection marker.
16. The use as claimed in claim 15 in *Ashbya gossypii*.

